دراسة التعدد المظهري لجين Angiotensin Converting enzyme (ACE) Polymorphism gene مع متلازمة تكيس المبيض المتعدد Polycystic ovary Syndrome (PCOS)

1- م.م . لقاء حسون صكَبان 2- أ.د. علي حمود السعدي 3- أ.د. ستار جاسم حتروش
(1و3) جامعة كربلاء- كلية التربية للعلوم الصرفة (2) جامعة بابل –كلية العلوم
** البحث مستل من أطروحة الدكتوراه للباحث الأول

الخلاصة :

أجريت هذه الدراسة لبيان مدى ارتباط التعدد المظهري لجين Angiotensin converting enzyme gene (ACE) والإصابة بمتلازمة تكيس المبيض المتعدد (PCOS) ، لوحظ وجود فروق معنوية ($P\leq 0.001$) بين النسب المئوية لتكرار الاليلات الثلاث (II, ID , DD) والنسب المئوية لكل من التكرار الكلي للاليل I و D بين مجموعة النساء المصابات بال (PCOS) ومجموعة نساء السيطرة حيث بلغت النسب % 20 , % 73.85 , 6.15% مقابل % 17 , 78% , % 5 على الترتيب ، كذلك وجدت الفروق المعنوية بين تكرار الاليل (D) والاليل (I) بين المجموعتين حيث بلغت نسبة تكرار الاليل D % 56.92 و % 56 أما الاليل I فبلغت % 43.08 و % 44 على الترتيب ، وجدت كذلك نفس الفروق المعنوية بين نسب تكرار الاليلات الثلاث داخل المجموعة الواحدة سواء كانت نساء لـ PCOS أو نساء السيطرة مع انخفاض تكرار الاليل II في كل من مجموعة النساء المصابات بالـ PCOS والنساء السليمات مقارنةً مع تكرار الاليلات الأخرى .

Abstract

The Present study was determined Correlation between polymorphism of Angiotensin converting enzyme gene (ACE) and Pathological the PCOS, A significant difference ($P\leq 0.001$) in percentages for the three alleles frequency (II, ID , DD) and between allele D and I between the two groups, that percentages Reached 20 % , 73.85 % , 6.15 % Compared to 17 % , 78% , 5% Respectively and also found A significant difference between frequency of allele (D) and allele (I) that percentage of Reached 56.92 % , 56 % to frequency allele (D) , As percentage frequency to allele (I) Reached 43.08 % , 44% Respectively, A same significant difference found in the frequency of alleles within each group (PCOS and control); in addition the DI allele increased significantly in both groups; and .with decreased II frequency in two groups compare with frequency others Alleles .

المقدمة : Introduction

تُعد متلازمة تكيس المبيض المتعدد PCOS (Polycystic Ovary Syndrome) أكثر الاضطرابات الهرمونية والوراثية شيوعاً لدى النساء ، إذ وصفت لأول مـرة من قبل العالـمان Stein وLeventhal في عام 1935 (1) ، وتقدر نسبة الإصابة بالمتلازمة حوالي (15-20 %) من النساء قي العالم في عمر الإنجاب (12-45) سنة (2) , وتعد السبب الرئيس للعقم سواء كان أولي أو ثانوي لدى النساء , وبينت الدراسات بأن 26% من النساء المصابات بالتكيس تكون ضمن العقم الأولي و 14% منهن تكون ضمن العقم الثانوي و30 % يتضمن دورة شـهرية منـتظمة 50 % يعانين مـن نـدرة الحيض و 20% يعانين من انقطاع الحيض(3).

أن متلازمة تكيس المبيض هي حالة غير متجانسة سريـرياً Heterogeneous status في النساء المتضررات ، إذ تحدث PCOS في الغالبية العظمى من المجتمعات وتلعب العوامل البيئية والوراثية أثراً كبيراً في إحداث المرض , ولكن السبب الرئيس لحدوثها غير معروف بشكل دقيق ومؤكد (4) . هناك الكثير من السمات السريرية والكيموحياتية للمتلازمة ، منها زيادة مستويات الهرمونات الاندروجينية hyperandrogenesis كزيادة مستوى الهرمون الذكري (Testosterone hormone) عن الحد الطبيعي مما يسبب انعدام الخصوبة Infertility فـي أغـلب الحـالات و انعـدام التبويض Anovulatory والشعرانية Hirsutism (5) ، كـذلك تعـد مقاومة الأنسولين Insulin Resistant (IR) وزيادة الأنسولين من الاضطرابات الوظيفية الايضية Metabolic disorders الرئيسة المصاحبة للنساء المصابات بالمتلازمة ، اذ ان حـوالي 70% منـهن يتعرضن لمقاومـة الأنسولين الـتي تـتطور للإصابة بمـرض السـكري الـنوع الثـاني (6).

تلعب الوراثة دوراً كبيراً في أحداث المتلازمة ، فقد وجـد أن المرأة الـتي فـي عائلتها فـرداً واحداً أو أكثر مصاباً بـ PCOS كالأم أو الأخت تـكون أكثر عـرضة لخـطر الإصـابة بها دون غـيرها (7) وقد أثبتت الدراسات أن حوالي 100جين مرشح على الأقل تسهم في حدوث المرض (8) منها الجينات المسؤولة عن تصنيع الهرمونات الستيرويدية

Steroids Hormones كجينات (CYP19 ,CYP11A, CYP21, CYP17) أو التي تساهم بالالتهابات المزمنة (Chronic inflammation) مثل جينات (TPA , PTI-1 , TNF-a genes) أو التي تشترك بعملية التكاثر ومقاومة الأنسولين منها جينات (FSHR , INSR , IL-6) (9). يسبب المرض مضاعفات أخرى على المدى البعيد والناتجة بصورة أساس من زيادة الوزن Obesity ومقاومة الأنسولين كارتفاع ضغط الدم Hypertension (10) وأمراض القلب الوعائية المزمنة Cardiovascular Diseases(CVD) (11) وإسقاط الحمل المتكرر (12), (13) Recurrent pregnancy loss (RPL) وتجلط المدماغ وسرطان كل من بطانة الرحم Endometrial carcinoma والمبيض Ovarian cancer والثدي Breast Cancer (14),(15) .

يعد أنزيم Angiotensin converting enzyme (ACE) أحد مكونات جهاز الرنين rennin angiotensin (RAS) system (16) ، يعرف بتسميات عدة" منها peptdyl dipeptidase , Kininase (17)، كما يؤثر نظام RAS على العديد من العمليات منها نضج الخلايا البيضية (Oocyte Maturation) والتبويض وتصنيع الستيرويدات (Ovulation and steroidogenesis) ، فضلاً عن تكوين الجسم الأصفر Corpus luteum من خلال سلسلة تفاعلات معقدة مع أنظمة الجسم المختلفة (18) , (19) ويشفر هذا الانزيم من قبل جين ACE ويمكن التعبير عنه في أنسجة متعددة بما في ذلك المبيضين (20) ويلعب أنزيم ACE دوراً مهماً في تنظيم ضغط الدم Blood pressure وكذلك يرتبط مع نواتجه بعملية تصنيع الأوعية الدموية Angiogenesis لبطانة المبيض ovarian endothelium (21) من خلال عملية تحويل angiotensin I إلى angiotensin II وتثبيط فعالية برايدكاينين bradykinin واستئناف عملية الانقسام الاختزالي Meiosis (22) , (23) و تصنيع الستيرويدات (24) .

يقع جين ACE على الكروموسوم (17 q 23.3) (25) ، وأن هنالك تغير بين الأفراد المختلفة في تركيز أنزيم ACE البلازمي الذي يعود بطبيعته إلى التعدد المظهري الجيني لجين ACE التي تشمل الإدخال Insertion (I) والحذف Deletion (D) في المنطقة الغير المشفرة للتتابع القاعدي (DNA bp-287) الذي يقع في انترون رقم 16 من جين ACE ويدعى (ACE I / D polymorphism) الذي يعطي مؤشر لدراسة الارتباط بين ACE gene و الفسيولوجيا الامراضية للإمراض المختلفة ذات العلاقة (26) ,(27) ، فقد وجد ارتباط الاليل D لجين ACE مع حدة مرض التليف الكيسي Cystic Fibrosis (CF) (28) ، في حين لم تثبت وجود علاقة بين الاليل D وسرطان Nasopharyngeal carcinoma (29) .

أثبتت الدراسات التجريبية أن الأليل D مرتبط مع المستويات العالية من أنزيم (ACE) البلازمي (30) , (31) التي قد تؤدي إلى المستويات العالية من Ang-II والتي تلعب دوراً كبيراً في اضطراب تصنيع الهرمونات الستيرويدية ، كما يلعب انزيم ACE دوراً هاماً في تنظيم ضغط الدم ، وبما له من دور محتمل في تقدم أمراض القلب الوعائية في النساء المصابات بالـ PCOS (32) ، في حين توصلت دراسة إلى وجود مستقبلات Ang-II على الخلايا الستيرويدية التي تصنع الهرمونات الستيرويدية في نساء الـ PCOS (33) .

طرائق العمل Methods

جمع عينات الدم من النساء المصابات بالـ PCOS ونساء السيطرة Control

Collection of Blood Samples PCOS patients and Control

تم جمع عينات الدم من مركز الخصوبة في مستشفى الصدر التعليمي في محافظة النجف الأشرف ووضع (3) مل في أنابيب مانعة للتخثر EDTA بعد ما تم رجها بلطف لمنع تخثر الدم . شملت الدراسة (130) مريضة راجعت المركز، وتمت مقارنتهن مع (100) امرأة من الأصحاء مظهرياً ، وتم استثناء النساء المعالجات بالأدوية والمصابات بالإمراض الأخرى.

- **طريقة استخلاص الـ DNA Protocol of DNA Isolation**

تم استخلاص الـ DNA من الدم حسب تعليمات العدة (Kit) المجهزة من شركة Geneaid.

الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز

أجريت عملية الترحيل الكهربائي لـ DNA الناتج من الاستخلاص إذ أن تركيز الهلام المناسب لترحيل DNA هو 0.8 % وتمت عملية الترحيل الكهربائي حسب طريقة (34).

اختيار البادئ

تم اختيار البادئ Primer وكما موضح في الجدول رقم (3) لغرض أجراء الكشف الجزيئي ومعرفة التعدد المظهري للجينات والطفرات أن وجدت (18).

جدول رقم (1) تسلسل البرايمر المستخدم والمجهز من قبل شركة Alpha DNA

اسم الجين ومختصره	التسلسل
Angiotensin converting enzyme (ACE)	F- 5'-CTG GAG ACCACT CCC ATC CTT TCT-3
	R- 5'-GAT GTGGCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'

تخفيف البادئ Primer Dilution

جُهز البادئ من شـــركة Bioneer Company/ Korea كمسحوق مجفف Lyophilized product ، تم تحضير محلول الخزين Stock solution ومحـلول العمل Working solution بحسب تعليمات شركة Bioneer.، إذ حُضر المحلول الخزين بتركيز (100 picomols/ µl) . أما محلول العمل Working solution فحضر بتركيز (10 picomols/ µl) بعد تخفيفه بالماء المزال الأيون Deionized water.

تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل.Polymerase Chain Reaction (PCR)

يوضح الجدول رقم (2) المواد المستخدمة في الكشف الجزيئي باستخدام تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل للعينات المدروسة.

جدول رقم(2) يوضح المواد المستخدمة في تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل

Component	Reaction size 20 reaction
Taq DNA polymerase	1 U
Each: d NTP(d ATP ,d CTP, d GTP, d TTP)	250 µ M
Tris- Hcl (PH 9.0) Kcl	10 mM
Mgcl2 Stabilizer and tracking dye	30 mM
Template DNA	1.5 mM
Primer	5-10 ng
H2O	18 µl

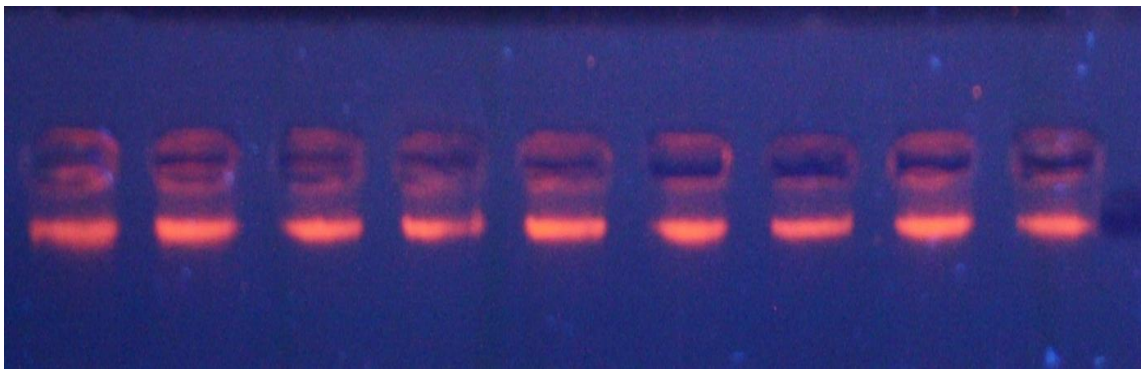
بعد ذلك تم مزج المواد أعلاه بواسطة جهاز المازج vortex ثم نُقلت ألأنابيب إلى جهاز الـــPCR.

جدول (3) البرنامج المستخدم للتعرف على التعدد المظهري لجين(ACE)
Angiotensin –Converting Enzyme (AC E) I /D gene Polymorphism

No.	Steps	Temperature	Time	No. of cycles
1	Initial Denaturation	94C°	2.5 min.	1
2	Denaturation	94C°	30 sec.	30
3	Annealing	60C°	105 sec.	
4	Extension	72C°	60 sec	
5	Final Extension	72C°	5 min	1
6	Final hold	4	-	

النتائج Results

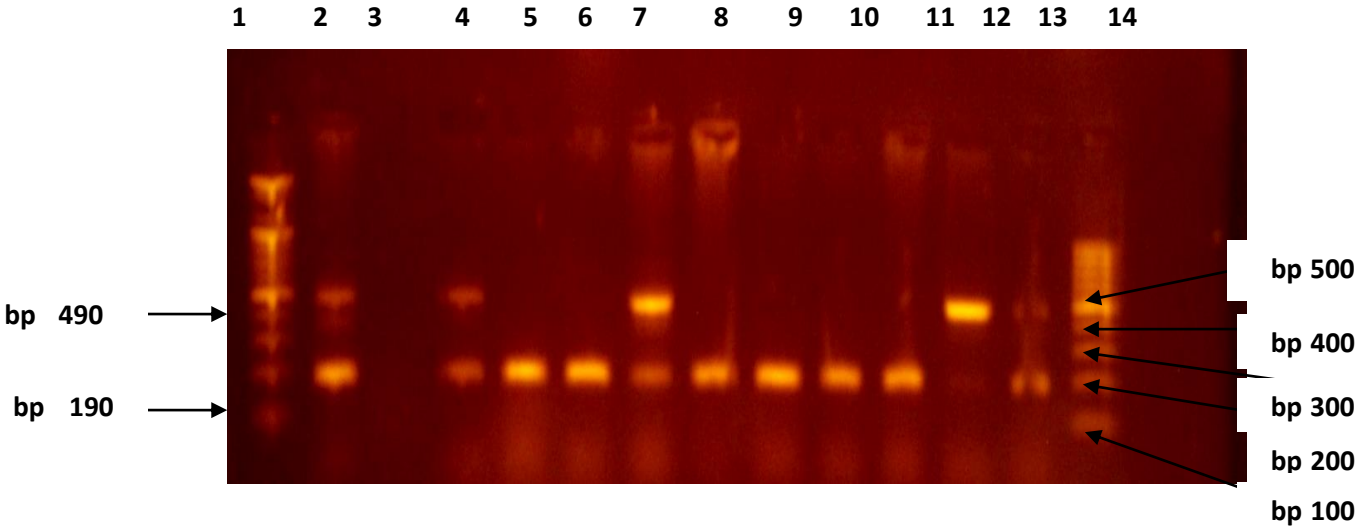
تم استخلاص الـ DNA من جميع عينات الدم قيد الدراسة ، أجري بعدها الترحيل الكهربائي للتأكد من وجود حزم الـــ DNA على هلام الاكارزو المحضر بتركيز (0.8 %) تحت فرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعة واحدة ، إذ يتم فحص الحزم تحت جهاز الأشعة فوق البنفسجية بعد تصبيغها بصبغة أثيديوم بروميد شكل (1) .



شكل (1) الترحيل الكهربائي لحزم الـــ DNA لعينات النساء المصابات بالـ PCOS على هلام الأكاروز المحضر بتركيز % 0.8 (70 فولت / سم – تيار 40 ملي أمبير) لمدة ساعة واحدة.

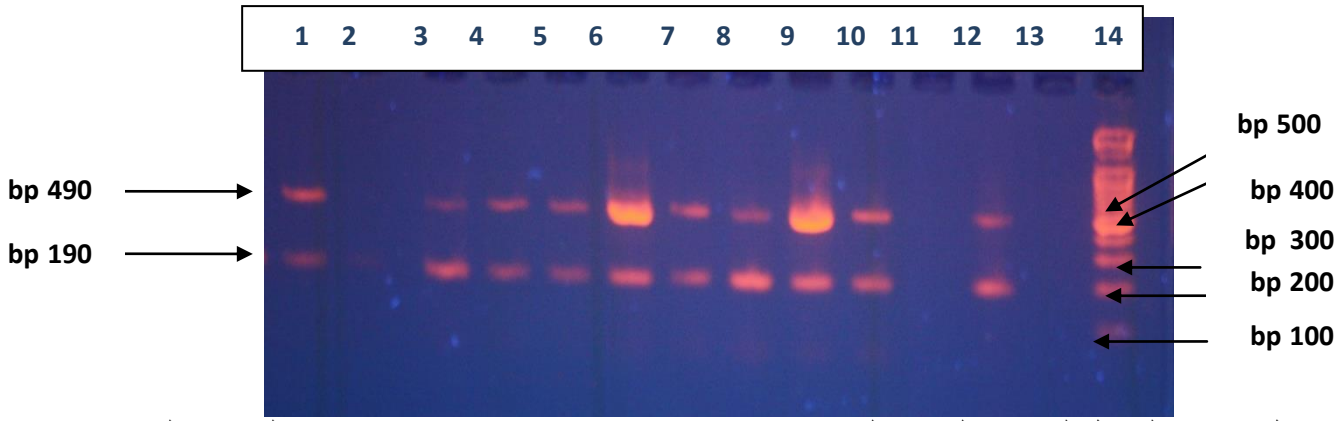
2-4-4 التوصيف الجزيئي للتعدد المظهري لجين ACE.

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لناتج الـ PCR وجود ثلاثة أنواع من الطرز الوراثية للمجموعتين ، طراز وراثي متماثل Homozygous(Deletion) (DD) تمثل بالحزمة ذات الحجم الجزيئي 190 bp وطراز وراثي متماثل (Insertion) Homozygous (II) تمثل بالحزمة 490 bp وطراز وراثي غير متماثل Heterozygous (ID) تمثل بالحزمتين (bp490, bp 190) (الشكلين (4-15 و (4-16).



شكل (2) ناتج الترحيل الكهربائي الـPCR لجين ACE (Angiotensin converting Enzyme) لتوصيف التعدد المظهري على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ولمدة ساعتين.

المجال (1, 14) DNA Ladder (bp 1500-100) و (bp 1000-100)
المجال (5, 6, 8 , 9, 10, 11) الشكل الاليلي (DD) Deletion (bp 190)
المجال (12) الشكل الاليلي (II) Insrtion (bp 490)
المجال (13, 7 ,4 , 2) الشكل الاليلي (DI) (bp 490 , bp 190).



شكل (3) ناتج الترحيل الكهربائي الـPCR لجـين Angiotensin converting Enzyme (ACE) لتوصيف التعدد المظهري وسيادة الشكل الاليلي (D / I) في النساء المصابات بالـPCOS ونساء السيطرة ، على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت/ سم وتيار 40 ولمدة ساعتين.

المجال (1,3,4,5,6,7,8,9,10,12) الشكل الاليلي (DI) (490 , bp 190).
المجال (14) DNA Ladder (bp 1000-100)

يلاحظ من الجدول (4 -8) وجود فرق معنوي عالي (P≤ 0.001) في عدد تكرارات الاليلات الثلاثة (DD) و (DI) و (II) بين مجموعة نساء الـ PCOS ونساء السيطرة وكذلك الأمر بالنسبة لتكرار الاليل (D) و (I) الكلي. أما عند المقارنة بين العدد والنسب المئوية لكل من الأشكال الاليلة الجينية الثلاثة في كل مجموعة ، يلاحظ وجود فرق معنوي (P≤ 0.001) ففي مجموعة نساء المصابات بالـPCOS- بلغ تكرار الاليل ID أعلى النسب (73.85%) مقابل(% 20) و (% 6.15) لكل من تكرار الاليل DD و II على الترتيب ، كذلك الحال بالنسبة للعدد والنسب المئوية إلى الليلات الثلاثة بمجموعة السيطرة وظهر الفرق المعنوي (P≤ 0.001) بينها فقد بلغت نسبها (5%) (78%) ,(17%) , لكل من الاليل DD وDI وII على التوالي . كذلك لوحظ انخفاض في نسبة تكرار الاليل II للمجموعتين (6.15%) و (5%) على التوالي.

جدول (4) النسب المئوية للتعدد المظهري لتوصيف جين (ACE) في النساء المصابات بالـPCOS والسيطرة.

الطرز الوراثية لجين ACE	التعدد المظهري لجين ACE في نساء الـPCOS % (N)	التعدد المظهري لجين ACE في نساء السيطرة % (N)
DD	(26) %20.00 a B	(17) %17 b B
DI	(96) %73.85 a A	(78) %78 b A
II	(8) %6.15 a C	(5) %5 b C
P≤	0.001	0.001
D (Total)	(74) % 56.92 a A	(56) %56 b A
I (Total)	(56) %43.08 a B	(44) %44 b B
P≤	0.001	0.001

% (N) : (العدد) و النسبة المئوية

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنوياً.

المتوسطات التي تحمل حروف صغيرة مختلفة ضمن السطر الواحد تختلف معنوياً.

إذ تتوافق هذه النتيجة مع دراسات أخرى عديدة في هذا المجال (35) , (19) , (36) والتي أجريت في كل من دولة تركيا والصين الشعبية ، فقد توصلت أن تكرار الاليل DD كان مرتفعا وبمستوى معنوي (P≤ 0.001) بين نساء الـPCOS والسيطرة ، وفي دراسة أجريت في الصين الشعبية ، لم يظهر اية فروقات معنوية بين الاليلات الثلاثة لمجموعة نساء الـPCOS ونساء السيطرة (18)، في حين توصلت دراسة إلى ارتباط التعدد المظهري لجين ACE I/ D Polymorphism مع متلازمة الـPCOS في النساء بالمجتمع القوقازي وليس الآسيوي (37) .

يلعب جين أنزيم ACE دوراً هاماً في عملية تكوين الأوعية الدموية Angiotensin وأمراض الضغط وأمراض القلب الوعائية ، إذ يُعد جزء من جهاز الرينين Rennin angiotensin system (RAS) ، وعادة يرتبط الشكل الاليلي (DD) مع المستوى العالي لإنزيم ACE في حين يمثل الأليل (DI) الشكل المتوسط من مستوى الإنزيم بينما يمثل الإليل (II) انخفاض مستوى إنزيم ACE (26) , (37) .

أن التركيز العالي لمستوى إنزيم ACE يعمل على تحفيز عملية تكوين الأوعية الدموية في البطانة المبيضية (Ovarian Endothelium) وزيادة تجهيز الدم ، وربما يزيد من تجهيز الكولسيترول الذي يُعد سلف تكوين الهرمون الستيرويدي ، إذ أن زيادة ACE-Ang II تقوم بتنشيط فعالية هرمون LH وتثبيط إفراز هرمون البروجستيرون ومن ثم زيادة إفراز هرمون LH بوساطة عملية التغذية الإسترجاعية السالبة (Negative feedback) (18) .فضلاً عن ذلك يمكن أن يؤثر نظام جهاز (RAS) على محور الغدة النخامية (Hypothalamic – Pituitary axis) مما يؤدي إلى قيام Ang-II الداخلي والخارجي في الدماغ على تحفيز إفراز هرمون LH و هرمون GnRH (38) , (39) , (18) ، وهناك علاقة تربط DD مع حالة فرط الاندروجين المصاحبة لمتلازمة PCOS (ارتفاع هرمون التستوستيرون) وهذا ما تم التوصل إليه فعلاً في هذه الدراسة مما يؤكد أن لجين ACE دوراً كبيراً في تفاقم الأعراض السريرية لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد وأمراضية وحدوث المتلازمة فضلاً عن علاقة ACE I/D polymorphism مع الاضطرابات الايضية المصاحبة لمتلازمة تكيس المبيض المتعدد التي تشمل كل من مرض السكري النوع الثاني وأمراض القلب الوعائية وضغط الدم (18) .

References:

1- **Roe, A. H. and Dokras, A. (2011).** The Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome in Adolescents. Rev Obstet Gynecol., 4(2):45-51.

2-Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 (2004). Consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril., 81:19-25.

3-Futterweit, WM.(1998). Polycystic ovarian disease :Etiology ,diagnosis and treatment .Compr.Ther.,14:12-20.

4- Sheikhha MH.; Kalantar SM. and Ghasemi, N. (2007). Genetics of polycystic ovary Syndrome. Iranian Journal of Reproductive Medicine, 5 (1):1-5.

5- Leon, S.; Robert, H.G. and Nalhan, G.K.(1994). An ovulation and the polycystic ovary clinical gynecologic endocrinology and infertility .5th edition .

6- Diamanti-Kandarakis E, Argyrakopoulou G, Economou F, Kandaraki E, Koutsilieris M. (2008). Defects in insulin signaling pathways in ovarian steroidogenesis and other tissues in polycystic ovary syndrome (PCOS). J Steroid Biochem Mol Biol.109.,(3-5):242-246.

7- Louis, V. (2007). "Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)" U.S. Department of Health and Human Services, office on Women's Health; 1-6.

8- Goodarzi, MO. (2008). Looking for polycystic ovary syndrome genes: Rational and best strategy. Semin Reprod Med ; 26(1): 5-13.

9- Prapas, N.; Karkanaki, A.; Prapas, I.; Katsikis,. I and Panidis, D.(2009). Genetic of polycystic ovary syndrome. HIPPOKRATIA. 13(4) : 216-223.

10- Chen , M.j.; Yang , W.S., Yang , JH , Chen , C .L .Ho , H. N. and Yang , Y,S. (2007) . Relationship between androgen levels and blood pressure in young women with polycystic ovarian syndrome .Hyperten.,49: 1442-1447.

11- Cussons AJ, Watts GF, Burke V, Shaw JE, Zimmet PZ, Stuckey BG. (2008). Cardiometabolic risk in polycystic ovary syndrome: a comparison of different approaches to defining the metabolic syndrome. Hum Reprod.,23:2352-2358.

12- Norman, RJCA.(2000). Lifestyle factors in aetioloy and management. In: Polycystic Ovary Syndrome. 1st ed. Cambridge University Press.

13- Kazerooni, T.; Ghaffarpasand, F.;Asadi, N.; Dehkhoda, Z.; Dehghankhalili, M. and Kaserooni, Y. (2013). Correlation between thrombophilia and recurrent pregnancy loss in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): A comparative study. J Chin Med Assoc;76:282-288.

14- Balen, A.(2001). Polycystic ovary syndrome and cancer. Human Reproduction Update. 7(6):522-525.

15- Spritzer, PM.; Morsch, DM. and Wiltgen, D.(2005). Polycystic ovary syndrome associated neoplasms. *Arq Bras Endocrinol Metabol*., 49(5):805-10.

16- **Yang, M; Qiu, C-C; Xu, Q and Xiang, H-D.(2006).** Association of Angiotensin Converting Enzyme Gene I/D polymorphism With Type 2 Diabetes Mellitus. *BIOMEDICAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES.* , 19: 323-327**.**

17- **Karabulut , A; Turgut,S ; Turgut, G.(2010).** Angiotensin converting enzyme gene insertion /deletion polymorphism in patients with polycystic ovary syndrome . Gynecol. Endocrinol.26 (6): 393-398.

18- **Sun, J.; Fan, H.; Che, Y.; Cao, Y.; Wu, X; Sun, H.; Liang, F.; Yi, L and Wang, Y. (2009).** Association between *ACE* gene I/D polymorphisms and hyperandrogenism in women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and controls. *BMC Medical Genetics*, 10:64.

19- Bayram, B.; Sayın, E.; Güneş, H.V.; Değirmenci, İ.; Türkoğlu, Z.; Doganer, F. and Turgut Coşan, D.(2011). DD genotype of ACE gene I/D polymorphism is associated in a Turkish study population with osteoarthritis. Mol. Biol. Rep. 38, 1713–1716.

20- van Sande ME, Scharpé SL, Neels HM, Van Camp KO.(1985). Distribution of angiotensin converting enzyme in human tissues. *Clin Chim Acta*., **147(3):255-60.**

21-Plendl,J.;Neumiiller,C.;Vollmar,A.;Auerbach,R.and Sinowatz,F.(1996). Isolation and characterization of endothelial cells from different organs of fetal pigs.*Anat Embryol*.,194:445-456.

22- Giometti, IC.; Bertagnolli, AC.; Ornes, RC.; Da Costa, LF.; Carambula, SF.; Reis, AM.; De Oliveira, JF.; Emanuelli, IP. and Gonçalves, PB. (2005). Angiotensin IIreverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*, 63(4):1014-25.

23- Stefanello, JR.; Barreta, MH.; Porciuncula, PM.; Arruda, JN.; Oliveira, JF.; Oliveira, MA. and Gonçalves, PB.(2006). Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology*, 66(9):2068-2076.

24- Unsal, T.; Konac, E.; Yesilkaya, E.; Yilmaz, A.;Bideci, A.; Onen, H.I.; Cinaz, P. and Menevse, A.(2009) . Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP1A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *J. Assist. Reprod Genet*., 26: 205–216.

25- **Rai, TS.; Dhandapany, PS.; Ahluwalia, TS.; Bhardwaj, M.; Bahl, A.; Talwar, KK.; Nair, K.; Rathinavel, A and Khullar, M. (2008).** ACE I/ D polymorphism in Indian patients with hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. Mol Cell Biochem , 311: 67-72 .

26- Rigat, B.; Hubert, C.; Alhenc-Gelas, F.; Cambien, F.; Corvol, P. and Soubrier, F. **(1990).** An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin Iconverting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 86:1343-1346.

27- Turgut, S.; Akın, F.; Akcılar, R.; Ayada, C. and Turgut, G. (2011). Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen M235T and AT1-R A/C1166 gene polymorphisms in patients with acromegaly. *Mol. Biol. Rep*., 38 (1): 569–576.

28- Marson, F.A.L.; Bertuzzo, CS.l .; Hortencio, T.D.R.; Ribeiro, JD.; Bonadia, L.C. and Ribeiro, A.F. (2012). The ACE gene D/I polymorphism as a modulator of severity of cystic fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine* , 12:41 .

29- Li, Z-H; Pan, X-M; Han, B-W; Han, H-B; Zhang, Z and Gao, L-B. (2011). No association between ACE polymorphism and risk of nasopharyngeal carcinoma. Journal of the Renin–Angiotensin Aldosterone System. 13(1): 210-215.

30- **Nakai, K.; Itoh, C.; Mitura, Y.;Hotta, K.; Musha, T.; Itoh, T.; Miyakawa ,T.; Iwasaki,R. and Hiramori, K. (1994).** Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. . Circulation. 90(5):2199-202.

31- **Winkelmann, BR.; Nauck, M,.; Klein, B.; Russ, AP.; Böhm, BO.; Siekmeier, R.; Ihnken, K.; Verho, M.; Gross, W and März, W.(1996).** Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with increased plasma angiotensin-converting enzyme activity but not with increased risk for myocardial infarction and coronary artery disease.*Ann Intern Med*., 125(1):19-25.

32- **Ferreira, R.; Oliveira, JF.; Fernandes, R.; Moraes, JF. and Gonçalves, PB. (2007).** The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction*, 134(5):713-9.

33- **Yoshimura, Y.(1997)**. The Ovarian Renin-Angiotensin System in Reproductive Physiology, Frontiers in neuroend ocrinology. *Front Neuroendocrinol* . 18(3):247-291.

34- **Sambrook,J. ; Fritsch,E.F. and Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual . 2nd edition, Cold spring harbor laboratory press,cold spring Harbor, New York.

35-**Cao Y,Wang Y,Zhou P,et al.(2002).**Relationship between ACE gene polymorphism and the renin-angiotensin system in PCOS patients.*Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics*.,18:665–666.

36- **Deepika , M.L.N.; K. Ranjith Reddy, K.; Usha Rani, V.; Balakrishna, N .; Prasanna Latha , K and Jahan, P .(2013).** Do ACE I/D gene polymorphism serve as a predictive marker for age at onset in PCOS? **.** Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 30(1):125-130.

37- **Jia, H.; Wang, B.; Yu, L. and Jiang, Z. (2012).** Association of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 0(0):1–8.

38- **Steele, MK.; Gallo, RV. and Ganong, WF. (1983).** A possible role for the brain renin-angiotensin system in the regulation of LH secretion. *Am J Physiol*; 245: R805–R810.

39- **Ganong, WF. (1993).** Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol*; 14: 233–249.